



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/47, G01N 33/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/41280 (43) Date de publication internationale: 19 août 1999 (19.08.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00338 (22) Date de dépôt international: 16 février 1999 (16.02.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/01823 16 février 1998 (16.02.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMIS-SARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): DESLYS, Jean-Philippe [FR/FR]; 5, rue de la Ferme, F-78150 Le Chesnay (FR). (74) Mandataires: ORES, Béatrice etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: METHOD FOR PURIFYING PrPres FROM A BIOLOGICAL SAMPLE AND APPLICATIONS (54) Titre: PROCEDE DE PURIFICATION DE LA PrPres A PARTIR D'UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE ET SES APPLICATIONS (57) Abstract <p>The invention concerns a method for purifying PrPres from a biological sample to be used for qualitative and/or quantitative determination of the PrPres in said sample. The method essentially consists in: (1) incubating, during 30 seconds to 2 hours, at a temperature less than 80 °C, said biological sample with a buffer solution A comprising at least a surfactant in an amount ranging between a quarter and four times the weight of the biological sample and optionally a protease, to form a suspension S1; (2) adding to said suspension S1 resulting from (1) a buffer solution B in an amount sufficient for thinning said suspension, which buffer solution B consists of a solvent or mixture of solvents, which does not solubilize the PrPres and has a constant dielectric ranging between 10 and 25; (3) centrifuging the suspension S2 resulting from step (2); and (4) solubilizing said pellet in a buffer solution C comprising at least a surfactant and/or at least a chaotropic agent, at a temperature ranging between room temperature and 100 °C.</p> (57) Abrégé <p>Procédé de purification de la PrPres à partir d'un échantillon biologique en vue de son utilisation pour la détection qualitative et/ou quantitative de la PrPres dans ledit échantillon. Ledit procédé comprend essentiellement: (1) l'incubation, pendant 30 secondes à 2 heures, à une température inférieure à 80 °C, dudit échantillon biologique avec un tampon A comprenant au moins un agent tensioactif en quantité comprise entre le quart et quatre fois le poids de l'échantillon biologique et éventuellement une protéase, pour former une suspension S1; (2) l'addition, à ladite suspension S1 obtenue en (1) d'un tampon B en quantité apte à éclaircir ladite suspension, lequel tampon B est constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants, qui ne solubilise pas la PrPres et présente une constante diélectrique comprise entre 10 et 25; (3) la centrifugation de la suspension S2 obtenue à l'étape (2); et (4) la solubilisation dudit culot dans un tampon C comprenant au moins un agent tensioactif et/ou au moins un agent chaotrope, à une température comprise entre la température ambiante et 100 °C.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCEDE DE PURIFICATION DE LA PrPres A PARTIR D'UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE ET SES APPLICATIONS.

La présente invention est relative à un nouveau procédé de purification de la PrPres à partir d'un échantillon biologique en vue de son utilisation pour la
5 détection qualitative et/ou quantitative de la PrPres dans ledit échantillon.

Les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles sont provoquées par des agents transmissibles non conventionnels (ANTC), encore appelés prions, dont la nature précise demeure inconnue à ce jour. Les ESST comprennent essentiellement la maladie de Creutzfeldt-Jakob, chez l'homme (MCJ ou CJD pour
10 Creutzfeldt-Jakob *disease*), la tremblante, chez le mouton et la chèvre et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB ou BSE pour *bovine spongiform encephalopathy*), chez les bovins ; d'autres encéphalopathies ont été mises en évidence chez le vison ou certains animaux sauvages, tels que le cerf et l'élan.

Ces maladies sont d'évolution constamment fatale et il n'existe, à
15 l'heure actuelle, aucun traitement efficace.

Dans les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles, il existe une accumulation d'une protéine de l'hôte, la PrP (ou protéine du prion), sous une forme anormale (PrPres), principalement dans le système nerveux central ; la PrPres copurifie avec l'infectiosité et son accumulation précède l'apparition des
20 lésions histologiques. *In vitro*, elle est toxique pour des cultures de neurones.

Deux propriétés biochimiques permettent habituellement de distinguer la PrPres de la PrP normale : la PrPres est partiellement résistante aux protéases et est insoluble dans les agents tensioactifs anioniques.

Pour pouvoir détecter la PrPres présente dans un échantillon, il est
25 nécessaire de soumettre ce dernier à différentes opérations, pour enrichir ledit échantillon en PrPres, tout en éliminant la PrP normale, de manière à ce que la PrPres puisse ensuite être détectée par toute méthode spécifique appropriée, sans entraîner :

. de faux-positifs, dus à une présence de PrP normale ou d'autres contaminants, ou

30 . de faux-négatifs, dus à une concentration insuffisante de PrPres dans l'échantillon biologique final.

Dans ce but, un certain nombre de procédés d'isolement et/ou de purification de la PrPres ont été proposés. Ils sont essentiellement basés sur la méthode mise au point par Hilmert et Diringer (Nature, 1983, 306, 476-478) et comprennent, de manière générale, une extraction par un détergent, des ultracentrifugations différentielles et un traitement par des enzymes protéolytiques (Multhaup G. et al., EMBO J., 1985, 4, 6, 1495-1501 ; Takahashi K. et al., Microbiol. Immunol., 1986, 30, 2, 123-131 ; Hope J. et al., EMBO J., 1986, 5, 10, 2591-2597 ; Grathwohl KUD et al., Arch. Virol., 1996, 141, 1863-1874 ; Kascsak RJ et al., Immunol. Investig., 1997, 26, 259-268 ; R.E. Race et al., J. Gen. Virol., 1992, 73, 3319-3323 ; Doi et al., J. Gen. Virol., 1988, 69, 955-960 ; T. Muramoto et al., Am. J. Pathol., 1993, 143, 5 1470-1479 ; Farquhar C.F. et al., Gen. Virol., 1994, 75, 495-504 et J. Gen. Virol., 1996, 77, 1941-1946). Ils ont l'inconvénient de comporter un nombre important d'étapes incluant plusieurs ultracentrifugations, qui sont lourdes à mettre en œuvre et entraînent des pertes cumulatives de PrPres, qui conduisent alors à une sensibilité insuffisante pour obtenir un seuil de détection et une quantification fines de la PrPres.

Ces différentes méthodes nécessitent un appareillage de laboratoire de recherche et des temps de mise en œuvre, qui ne sont pas compatibles avec une utilisation sur le terrain, en particulier dans les abattoirs.

Or, il existe un besoin de vérification rapide de l'absence ou de la présence d'une encéphalopathie subaiguë spongiforme transmissible, au moment de l'abattage de l'animal.

En conséquence, l'Inventeur s'est donné pour but de pourvoir à un procédé de purification d'un échantillon biologique en vue de son utilisation pour une détection rapide et fiable de la PrPres, qui soit suffisamment simple à mettre en œuvre pour qu'il puisse être utilisé sur le terrain, et notamment dans les abattoirs et qui réponde ainsi mieux aux besoins de la pratique que les procédés de l'Art antérieur.

En effet, le procédé selon l'invention :

- est simple à mettre en œuvre.
- est fiable
- est facile à interpréter : il augmente le seuil de sensibilité de détection de la PrPres, en éliminant les faux-positifs (PrP normale et autres contaminants)

et il élimine les faux-négatifs, car il permet d'obtenir, en valeur absolue, une quantité importante de PrPres, puisqu'il est possible de traiter des quantités importantes de matériel biologique avec un rendement de purification supérieur à 80 % ; ceci est particulièrement intéressant dans les abattoirs et fournit des échantillons dans lesquels la PrPres est facilement détectable avec des tests de diagnostic usuels.

La présente invention a pour objet un procédé de purification de la PrPres à partir d'un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement :

(1) l'incubation pendant 30 secondes à 2 heures, de préférence pendant 30 secondes à 10 minutes, à une température inférieure à 80°C, dudit échantillon biologique avec un tampon A comprenant au moins un agent tensioactif, en quantité comprise entre le quart et quatre fois, de préférence entre le quart et une fois et demi le poids de l'échantillon biologique et éventuellement l'incubation préalable, postérieure ou simultanée avec une protéase, pour former une suspension micellaire ou lamellaire S1 opalescente à trouble ; n'importe quel agent tensioactif ou mélange d'agents tensioactifs, dans les conditions de température et de quantités précitées ne solubilisent pas la majorité de la PrPres, qui reste en suspension, alors que la PrP normale est solubilisée, voire détruite, en cas d'adjonction de protéase ; ladite incubation est de préférence réalisée à une température inférieure à 50°C, en présence d'une quantité d'agent tensioactif comprise entre le quart et une fois et demi le poids de l'échantillon biologique ; conformément à l'invention, la protéase peut en effet être ajoutée soit avant l'adjonction de l'agent tensioactif, soit après, soit simultanément ;

(2) l'addition, à ladite suspension micellaire ou lamellaire S1 obtenue en (1) d'un tampon B en quantité apte à éclaircir ladite suspension (formation d'une microémulsion ou d'une microsuspension, par exemple), lequel tampon B est constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants, qui ne solubilise pas la PrPres et présente une constante diélectrique comprise entre 10 et 25 ; on obtient ainsi une suspension S2 limpide à l'œil nu ;

(3) la centrifugation de la suspension S2 obtenue à l'étape (2) ; ladite centrifugation est par exemple effectuée pendant 2 à 10 minutes, à une vitesse inférieure à 20 000 g, de préférence à une vitesse comprise entre 3 500 g et 17 500 g ; la

PrPres se retrouve dans le culot de centrifugation, avec un rendement de purification en PrPres compris, de manière surprenante, entre 80 et 100 % ; de manière avantageuse, le temps et la vitesse de centrifugation peuvent être adaptés pour aboutir au même résultat, à savoir l'obtention d'un rendement de purification en PrPres compris
5 entre 80 et 100 % et

(4) la solubilisation dudit culot dans un tampon C comprenant au moins un agent tensioactif, tel que défini à l'étape (1), à une concentration comprise entre 0,1 % et 5 %, de préférence comprise entre 0,25 % et 1 %, par rapport au volume de tampon C (p/v) et/ou au moins un agent chaotrope à une concentration comprise
10 entre 0,1 M et 8 M et à une température comprise entre la température ambiante et 100°C, de préférence égale ou supérieure à 80°C ; dans de telles conditions de température, les agents tensioactifs précités, de préférence les agents tensioactifs ioniques, et/ou les agents chaotropes solubilisent la PrPres.

Lesdites étapes (1) et (2) peuvent être réalisées simultanément ou
15 successivement ; de préférence, elles sont réalisées successivement.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, lorsque l'échantillon biologique est un tissu ou un organe, ce dernier est, préalablement à l'étape (1), homogénéisé, par exemple par broyage mécanique, dans un tampon d'homogénéisation, constitué d'un tampon neutre, tel que l'eau ou d'un tampon isotonique, tel que le glucose à 5 %.
20

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, la température mise en œuvre à l'étape (1) est comprise entre la température ambiante et 50°C ; elle est de préférence de 37°C.

De manière préférée, le tampon A comprend un agent tensioactif
25 sélectionné dans le groupe constitué par :

- des tensioactifs anioniques, tels que le SDS (dodécylsulfate de sodium), le sarkosyl (lauroyl sarcosine), le cholate de sodium, le désoxycholate de sodium, le taurocholate de sodium,
- des tensioactifs zwitterioniques, tels que le SB 3-10 (décyl sulfobétaïne), le SB 3-12 (dodécyl sulfobétaïne), le SB 3-14, le SB 3-16 (hexadécyl sulfobétaïne), le CHAPS et le désoxyCHAPS.
30

- des tensioactifs non-ioniques, tels que le C12E8 (dodécyl octaéthylène glycol), le Triton X100, le Triton X114, le Tween 20, le Tween 80, le MEGA 9 (nonanoyl méthyle glucamine), l'octylglucoside, le LDAO (dodécyl diméthylamine oxyde) ou le NP40 ou

5 - des mélanges de tensioactifs tels qu'un mélange d'un agent tensioactif ionique et d'un agent tensioactif non-ionique et notamment le mélange SDS-Tween 80 ou le mélange sarkosyl-Triton X100 ou le mélange de deux agents tensioactifs ioniques, tel que le mélange SDS-désoxycholate ou d'un mélange d'un agent tensioactif ionique et d'un agent tensioactif zwitterionique.

10 Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, le tampon B est de préférence sélectionné parmi les alcools en C₃-C₆ et les mélanges d'alcool dont la constante diélectrique théorique moyenne est comprise entre 10 et 25. Les alcools ou mélanges d'alcools suivants sont particulièrement préférés : butanol-1, butanol-2, méthyl-2 propanol-1, isopropanol, isopropanol + pentanol, éthanol +
15 hexanol, butanol + pentanol, etc...

On entend par constante diélectrique, au sens de la présente invention, la constante diélectrique statique ϵ , mesurée dans des champs statiques ou à fréquence relativement faible ; elle correspond au rapport déplacement électrique D/force du champ électrique E, lorsque un champ électrique est appliqué à la solution,
20 à une température comprise entre 293,15 et 298,15 K.

La constante diélectrique des liquides, telle que définie ci-dessus, est plus particulièrement décrite dans CRC Handbook of Chemistry and Physics (Ed. David R. Lide, 75^{ème} édition, 1994, CRC Press).

Pour un mélange de solvants, on entend par constante diélectrique
25 théorique moyenne, la moyenne des constantes diélectriques de chaque solvant, pondérée par sa proportion dans le mélange.

L'addition du tampon B à l'étape (2) permet, de manière surprenante, d'obtenir des rendements de purification supérieurs à 90 %, avec des conditions de centrifugation à faible vitesse ; elle permet tout en maintenant un rendement impor-
30 tant, de diminuer de manière significative la quantité de culot final : de manière avantageuse, la quantité de culot final est de préférence inférieure à 10 % du poids

d'échantillon biologique de départ pour permettre effectivement de l'utiliser dans le cadre d'un dosage immunologique, alors que lorsqu'on ne rajoute que du tampon A, on se situe dans les conditions de l'Art antérieur, qui imposent une ultracentrifugation pour obtenir des rendements suffisant en PrPres, en vue d'une détection.

5 On peut noter que l'on peut également obtenir des rendements de purification supérieurs à 80 %, en faisant varier le temps et la vitesse de centrifugation : 2 à 10 minutes à une vitesse inférieure à 20 000 g ou pendant une durée diminuée proportionnellement à l'augmentation du nombre de g.

De manière préférée, le rapport rendement en PrPres dans la phase
10 solide/quantité de culot récupéré après centrifugation de la suspension S2 est supérieur à 10, lorsque l'échantillon de départ correspond à 100 mg de cerveau.

Egalement de manière préférée, le tampon C mis en œuvre à l'étape
(4) comprend un agent chaotrope, qui est notamment sélectionné dans le groupe constitué par l'urée et la guanidine ou un mélange de ceux-ci ; tout autre agent
15 chaotrope peut également être utilisé.

De préférence, l'urée est à une concentration comprise entre 0,25 et 8 M et la guanidine est à une concentration comprise entre 0,1 et 6 M.

Lorsque le tampon C est un mélange d'au moins un agent tensioactif et d'au moins un agent chaotrope, il est sélectionné, de manière préférée, dans le
20 groupe constitué par les mélanges suivants : mélange SDS et urée, mélange sarkosyl et urée, mélange désoxycholate et urée ou mélange sarkosyl et guanidine et sarkosyl, guanidine et urée. De manière préférée, dans le mélange SDS et urée, le SDS est à 0,25-1 % et l'urée est à 0,25-6 M ; dans le mélange sarkosyl et urée, le sarkosyl est à une concentration comprise entre 0,25 et 1 %, et l'urée est à une concentration
25 comprise entre 0,25 et 8 M ; dans le mélange sarkosyl et guanidine, le sarkosyl est à une concentration comprise entre 0,25 et 1 % et la guanidine est à une concentration comprise entre 0,5 M - 3 M et dans le mélange sarkosyl, guanidine et urée, le sarkosyl est à une concentration comprise entre 0,25 et 1 %, la guanidine est à une concentration comprise entre 0,5 M - 3 M et l'urée est à une concentration comprise entre 2 et
30 6 M.

Le tampon de Laemmli (SDS à 4 %, Tris-HCl 0.1 M pH 8, saccharose à 5 % et β -mercaptoéthanol à 2 %) peut également être utilisé, notamment pour les *Western blot*.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection de la PrPres dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

- le traitement dudit échantillon tel que défini ci-dessus,
- la dilution de l'échantillon obtenu si nécessaire et
- la détection de la PrPres par toute méthode analytique appropriée, telle qu'une méthode immunologique (ELISA, *Western blot*), produisant un signal spécifique.

L'étape de dilution précitée permet de neutraliser le tampon C, en vue d'une détection de la PrPres par une méthode ELISA ; elle est par exemple réalisée avec un tampon comprenant de l'albumine, conduisant à une concentration finale en albumine comprise entre 2 et 10 % (p/v) ou avec un tampon à base de désoxycholate, à 1 %, par exemple.

Un échantillon biologique ainsi traité contient une concentration efficace en PrPres, de manière à ce que cette dernière puisse être détectée par toute méthode analytique, notamment une méthode immunologique, directement dans cet échantillon.

En variante, la présente invention a pour objet un procédé de purification de la PrPres à partir d'un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement :

- (1) l'incubation, pendant 30 secondes à 2 heures, de préférence pendant 30 secondes à 10 minutes, à une température inférieure à 80°C, dudit échantillon biologique avec un tampon A comprenant au moins un agent tensioactif, en quantité comprise entre le quart et quatre fois, de préférence entre le quart et une fois et demi le poids de l'échantillon biologique et éventuellement l'incubation préalable, postérieure ou simultanée avec une protéase, pour former une suspension micellaire ou lamellaire S1 opalescente à trouble ; conformément à l'invention, la protéase est en effet ajoutée soit avant l'adjonction de l'agent tensioactif, soit après, soit simultanément ;

(2) l'addition, à ladite suspension micellaire ou lamellaire S1 obtenue en (1) d'un tampon B en quantité apte à former une séparation de phase, lequel tampon B est constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants, qui ne solubilise pas la PrPres et présente une constante diélectrique comprise entre 10 et 25 :

5 (3) la centrifugation de la suspension obtenue à l'étape (2) : ladite centrifugation est par exemple effectuée pendant 2 à 10 minutes, à une vitesse inférieure à 20 000 g, de préférence à une vitesse comprise entre 3 500 g et 17 500 g ; la PrPres se retrouve à l'interface :

(4) la récupération du film présent à l'interface ;

10 (5) la resolubilisation dudit film avec un tampon A sans protéase,

(6) la centrifugation de la suspension obtenue à l'étape (5), pendant 2 à 10 minutes, à une vitesse inférieure à 20 000 g, de préférence à une vitesse comprise entre 3 500 g et 17 500 g ; la PrPres se retrouve dans le culot de centrifugation, avec un rendement de purification en PrPres compris, de manière surprenante, 15 entre 70 et 100 % ; de manière avantageuse, le temps et la vitesse de centrifugation peuvent être adaptés pour aboutir au même résultat, à savoir l'obtention d'un rendement de purification en PrPres compris entre 70 et 100 % et

(7) la solubilisation dudit culot dans un tampon C comprenant au moins un agent tensioactif, tel que défini à l'étape (1), à une concentration comprise 20 entre 0,1 % et 5 %, de préférence comprise entre 0.25 % et 1 %, par rapport au volume de tampon C (p/v) et/ou au moins un agent chaotrope à une concentration comprise entre 0,1 M et 8 M et à une température comprise entre la température ambiante et 100°C, de préférence égale ou supérieure à 80°C ; dans de telles conditions de température, les agents tensioactifs précités, de préférence les agents tensioactifs ioniques, 25 et/ou les agents chaotropes solubilisent la PrPres.

Les quantités de tampon B à ajouter pour obtenir une microémulsion, une microsuspension ou une séparation de phase sont établies à l'aide d'une gamme de tampon B, comme illustré pour le butanol-1, à la figure 1 : elles peuvent varier en fonction du tampon A et des constituants sélectionnés pour le tampon B.

30 En variante, l'étape de solubilisation (étape (4) du premier procédé ou étape (7) du deuxième procédé) dans ledit un tampon C comprend le chauffage à

une température égale ou supérieure à 80°C. pendant 5 à 10 minutes, suivie d'une centrifugation de préférence pendant 2 à 10 minutes. à une vitesse inférieure à 20 000 g, de préférence à une vitesse comprise entre 3 500 g et 17 500 g ; dans ce cas, la PrPres est resolubilisée et se trouve dans le surnageant : dans de telles conditions, on obtient un échantillon particulièrement bien adapté à un dosage de la PrPres par une méthode ELISA.

La présente invention a également pour objet un kit de traitement d'un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend outre un tampon d'homogénéisation dudit échantillon biologique, des quantités convenables de tampon A, de tampon B et de tampon C, tels que définis ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un kit de détection de la PrPres, caractérisé en ce qu'il comprend des quantités convenables de tampon d'homogénéisation de l'échantillon biologique dans lequel la PrPres doit être détectée, des quantités convenables de tampon A, de tampon B et de tampon C tels que définis ci-dessus, ainsi qu'au moins un anticorps anti-PrPres convenable.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre l'influence de la quantité de tampon B (butanol) sur le rendement de purification de la PrPres (en %) et la quantité de culot obtenu après centrifugation ;

- la figure 2 illustre l'influence de différents tampons B sur le rendement de purification de la PrPres (en %) et la quantité de culot obtenu après centrifugation ;

- la figure 3 illustre le rôle de la constante diélectrique théorique moyenne, telle que définie ci-dessus, pour comparer différents mélanges d'alcools utilisés comme tampon B ;

- la figure 4 illustre un exemple de détection de la PrPres par Western blot :

- la figure 5 illustre la sensibilité et le rendement du test ELISA sur différentes dilutions d'échantillons traités, conformément à l'invention :

- la figure 6 illustre un test ELISA effectué directement sur des homogénats, et

5 - la figure 7 illustre une comparaison de différents tampons C.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Traitement d'un échantillon de cerveau bovin pour le dosage de
10 **la PrPres sur le terrain : sélection de la quantité de tampon B convenable.**

- On prélève 500 mg de cerveau bovin : on le broie et on l'homogénéise à 25 % (p/v) dans une solution de glucose à 5 %.

Pour réaliser l'homogénéisation, le prélèvement de cerveau (500 mg) et 1 ml de glucose sont introduits dans des tubes comprenant des billes en céramique,
15 sous agitation. On récupère le surnageant (environ 1,5 ml) ; les billes sont rincées en suspension dans 500 µl de glucose et agitées ; on récupère le surnageant obtenu qui est mélangé avec le surnageant précédent (2 ml).

- On incube 400 µl d'homogénat tel qu'obtenu ci-dessus (équivalent à 100 mg de cerveau) avec 400 µl de tampon A comprenant un mélange à part égale à
20 25 % (p/v) de SDS et à 25 % (v/v) de Tween 80 dans un rapport 1/1 (v/v) ainsi que de la protéinase K (0,1 mg/ml de tampon A, soit 0,4 mg/g tissu) pendant 10 minutes (2 fois 5 min) à 37°C (étape (1)). En variante, le tampon A comprend avantageusement du sarkosyl à 10 % et du Triton X100 à 10 % ; ce dernier tampon A, qui ne comprend pas de SDS est plus avantageux, car il n'entraîne pas de perturbation dans la détection
25 de la PrPres par des anticorps spécifiques, par une méthode de type ELISA.

- On ajoute 0 à 1 000 µl de butanol (tampon B) (étape (2)).

La figure 1 montre le rendement de purification en PrPres (%), quantifié en *Western blot* et la quantité de culot (en mg) en fonction de la quantité de tampon B ajoutée.

Cette figure montre qu'entre 10 et 53 %, la PrPres est maintenue en suspension et qu'entre 30 et 50 % de butanol, on obtient un rendement de purification de l'ordre de 100 % et un culot inférieur à 10 mg.

- On centrifuge à 3 800 g (4 000 RPM, centrifugeuse JOUAN)
5 pendant 10 minutes (étape (3)) ; on élimine le surnageant et on dissout le culot obtenu qui contient la PrPres avec 80-100 µl d'un tampon C (étape (4)) comprenant :

. soit du SDS à 0,5 % et de l'urée 0,5 M.

. soit un tampon de Laemmli.

. soit du sarkosyl à 0,5 % et de l'urée 6M

10 pendant 5 minutes à 100°C.

Ce traitement permet la dissolution de la PrPres : l'échantillon est directement prêt à être utilisé dans un dosage de type immunologique tel que ELISA ou *Western blot*.

Pour réaliser un ELISA, le culot est de préférence dissous dans un
15 tampon C comprenant du sarkosyl (0,25-1 %) et de l'urée (0,25-8M) ou du SDS (0,25-1 %) et de l'urée (0,25-1 M) ; l'échantillon obtenu sera de préférence dilué (au ¼ ou au ½), après chauffage, avec un tampon contenant de l'albumine conduisant à une concentration finale en albumine comprise entre 2 et 10 % (p/v) ou avec un tampon contenant du désoxycholate à 1 %.

20 En variante, l'échantillon dilué est chauffé à 100°C pendant 5-10 minutes puis centrifugé pendant 2 à 10 minutes, à une vitesse inférieure à 20 000 g, de préférence à une vitesse comprise entre 3 500 g et 17 500 g ; le surnageant est dilué entre le ¼ et le ½ avec un tampon ELISA.

Dans le cas présent, la quantification de la PrPres est réalisée en
25 *Western blot*, par mélange vol/vol avec du tampon de Laemmli ; l'échantillon dilué est ensuite déposé sur gel pour une détection par *Western blot* ; les quantités de PrPres détectées sont rapportées à une gamme linéaire de dilutions de PrPres purifiée dans les mêmes conditions que ci-dessus, à partir d'un même homogénat de cerveau de vache atteinte d'ESB, au stade terminal de la maladie (contrôle positif).

Les échantillons traités conformément au procédé selon l'invention, sont débarrassés du bruit de fond et permettent un dosage fiable, spécifique et quantitatif de la PrPres.

Le procédé selon l'invention permet d'augmenter le rendement de purification en PrPres, de manière significative :

en effet, lorsque l'on ne rajoute que du tampon A, le rendement en PrPres n'est que de l'ordre de 40 % ; on observe donc une perte de l'ordre de 60 % de la PrPres, notamment du fait de sa répartition entre la phase solide et la phase liquide ; de plus, le culot est important. Ceci explique pourquoi dans l'Art antérieur, les protocoles décrits utilisent le sarkosyl qui entraîne l'obtention de culots plus faibles, mais qui impose des ultracentrifugations lourdes pour avoir un rendement suffisant.

l'étape (2) permet d'augmenter le rendement en PrPres dans la phase solide : on obtient un rendement de l'ordre de 80-100 % dans la phase solide de la suspension S2, tout en diminuant la quantité de culot, comme précisé ci-dessus.

EXEMPLE 2 : Traitement d'un échantillon de cerveau bovin pour le dosage de la PrPres sur le terrain : variante de l'étape (1) et de l'étape (2).

- l'étape d'homogénéisation est identique à celle décrite à l'exemple 1.

- ensuite, on incube les 2 ml d'homogénat obtenus à partir des 500 mg de cerveau bovin, avec 2 ml de tampon A, dans les mêmes conditions que celles exposées à l'exemple 1 (étape (1)).

- on ajoute 3 ml de tampon B, dans les mêmes conditions que celles exposées à l'exemple 1 (étape (2)).

- la suite du procédé est identique à celui de l'exemple 1.

EXEMPLE 3 : Traitement d'un échantillon de cerveau bovin pour le dosage de la PrPres sur le terrain : variante de l'étape d'homogénéisation.

- On prélève 250 mg de cerveau bovin : on le broie et on l'homogénéise à 25 % (p/v) dans une solution de glucose à 5 %.

Pour réaliser l'homogénéisation, le prélèvement de cerveau (250 mg) et 750 µl de glucose sont introduits dans des tubes comprenant des billes en céra-

mique, sous agitation. pendant 40 secondes (appareil RIBOLYSER-HYBAID); on prélève 400 µl de surnageant puis on procède comme à l'exemple 1.

EXEMPLE 4 : Comparaison de différents tampons B sur le rapport rendement de purification en PrPres/quantité de culot.

L'échantillon est traité dans les mêmes conditions que celles exposées à l'exemple 1, à l'exception de la quantité de tampon B qui est de 600 µl.

La figure 2 illustre les rapports obtenus en *Western blot* avec différents tampons B : pentanol, butanol, mélange isopropanol + pentanol, mélange éthanol + hexanol, isopropanol et éthanol ; les mélanges ont été réalisés vol/vol.

EXEMPLE 5 : Comparaison des constantes diélectriques de différents mélanges et leur influence sur le rendement de purification en PrPres et la quantité de culot.

Le procédé est réalisé dans les conditions exposées à l'exemple 4.

La figure 3 illustre les résultats obtenus : dans le cas où le tampon B est un mélange d'alcools, le volume de chaque alcool est calculé en fonction de sa constante diélectrique et de la constante diélectrique théorique du mélange souhaitée (par exemple 17) et rapporter à 600 µl de volume total d'alcool. Par exemple, pour le mélange hexanol/éthanol on obtient la formule suivante :

$$13.y + 25 (1-y) = 17$$

y représentant le pourcentage d'hexanol, 13 étant la constante diélectrique de l'hexanol et 25 étant la constante diélectrique de l'éthanol.

Pour une constante diélectrique théorique moyenne de 15 ou moins, on observe une séparation de phase.

EXEMPLE 6 : Détection de la PrPres par *Western blot*.

*** Protocole :**

1) incubation à 37°C, 2 fois 5 min de 400 mg d'homogénat de cerveau de vache à 25 % (poids/volume) et de 400 µl de tampon A comprenant 400 µl d'un mélange à part égale (v/v) de SDS à 25 % (p/v) et de Tween 80 à 25 % (v/v) (50/50) et de protéinase K (PK) à 0.1 mg/ml de tampon A.

2) on ajoute 600 µl de tampon B (sauf échantillons des pistes 7 et 8 : 1 000 µl tampon B), constitué de butanol-1.

3) on centrifuge à 15000 RPM pendant 5 min (environ 17 000 g).

4) le culot de centrifugation est repris dans 100 µl de tampon de Laemmli contenant 4 % de SDS et chauffé à 100°C pendant 5 min.

* Western blot :

5 Les échantillons obtenus sont utilisés pour réaliser une électrophorèse SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose, dans les conditions décrites par Towbin et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979, 76, 4350-4354) ou par C.I. Lasmézas et al. (J. Gen. Virol., 1996, précité).

10 Avant d'être déposés sur le gel d'électrophorèse, les échantillons ont été dilués au 1/20 dans un témoin négatif, produit dans les mêmes conditions que celles exposées à l'exemple 1, à partir d'un homogénat de vache saine, en raison de l'importance des signaux. (gel de polyacrylamide à 12 % chargé avec l'équivalent de 10 mg (10 µl) de cerveau, correspondant à 9.5 mg de cerveau de vache saine et 0.5 mg de cerveau de vache infectée).

15 L'immunodétection de la PrPres a été réalisée avec l'antisérum JB007 (R. Demaimay et al., J. Virol, 1997, 71, 12, 9685-9689) au 1/5 000^{ème}, et des Ig de chèvre anti-lapin conjuguées à de la peroxydase (1/2500). L'immunoréactivité est révélée par chimioluminescence (ECL, Amersham), quantifiée et visualisée sur films autoradiographiques, comme illustré sur la figure 4.

20 La figure 4 illustre les résultats obtenus et correspond à la courbe propanol/hexanol de la figure 3A.

A cette figure, les pistes 1 à 6 correspondent à des échantillons traités en mettant en œuvre comme tampon B. différents mélanges propanol/hexanol, conduisant à différents constantes diélectrique théoriques moyennes ; les pistes 8 et 9
25 correspondant à des échantillons biologiques soumis à une procédure mettant en œuvre comme tampon B. 1000 µl de butanol (point 53 % de la figure 1) : on observe dans ce cas que l'ensemble de la PrPres se retrouve à l'interface ; les pistes 9 et 10 correspondant à des échantillons biologiques soumis à une procédure mettant en œuvre comme tampon B. 600 µl de butanol (point 43 % de la figure 1) : on observe
30 dans ce cas que l'ensemble de la PrPres se retrouve dans le culot (piste 10). alors que

dans un témoin négatif, traité dans les mêmes conditions (piste 9), on n'observe aucun signal.

EXEMPLE 7 : Dosage ELISA de la PrPres, à partir d'un échantillon obtenu conformément à l'invention.

5 On prépare un échantillon, dans les conditions suivantes :

- On prélève 400 mg de cerveau bovin : on le broie et on l'homogénéise à 20 % dans une solution de glucose à 5 % (1.6 ml), dans les mêmes conditions que celles exposées à l'exemple 1.

- On incube, à 37°C pendant 10 min (2 fois 5 min avec agitation intermédiaire), 500 µl d'homogénat obtenu avec 500 µl de tampon A comprenant du sarkosyl à 10 % et du Triton X100 à 10 % ainsi que de la protéinase K (80 µg/ml).

- On ajoute 500 µl de tampon B (butanol).

- On centrifuge à 15 000 rpm avec un rotor permettant d'obtenir 17 608 g, pendant 5 min ; les mêmes résultats sont obtenus avec un temps de centrifugation de 4 min à 20 627 g.

- On élimine le surnageant et on dissout le culot obtenu qui contient de la PrPres avec 100 µl de tampon C comprenant de l'urée 6 M et du sarkosyl 0,5 % pendant 5 min à 100°C.

- On centrifuge à 15 000 rpm avec un rotor permettant d'obtenir 17 608 g, pendant 5 min : les mêmes résultats sont obtenus avec un temps de centrifugation de 4 min à 20 627 g. Le surnageant est dilué au 1/3 dans du tampon EIA (tampon phosphate avec 0,5 % de désoxycholate).

Pour effectuer l'ELISA, l'échantillon obtenu est déposé à raison de 100 µl par puits, en duplicat sur une plaque recouverte avec un premier anticorps antiPrP (8G8, réf. Kraseman et al., Molecular Medicine 1996), puis on incube, lave et révèle avec un deuxième anticorps anti-PrP (12F10, réf. Kraseman et al., 1996) couplé à l'acétylcholinestérase (réf. Grassi et al., J. Immunol Methods, 1989). On incube avec le substrat de l'acétylcholine estérase puis la lecture se fait à 415 nm, 15 min ou 30 min, après ajout du substrat (réactif d'Ellmann).

30 Les résultats présentés dans la figure 5 sont relatifs à un homogénat à 20 % (poids/volume) de cerveau de vache cliniquement atteinte de ESB, dilué au

1/10, 1/100, 1/1 000 ou 1/10 000 dans un homogénat à 20 % (poids/volume) d'un cerveau de vache saine.

Les échantillons sont alors traités dans les conditions décrites ci-dessus, et testés sur test EIA avec l'anticorps 8G8 en capture et l'anticorps 12F10 en
5 anticorps de détection.

Les échantillons sont testés dilués dans le tampon de dépôt EIA (dilutions au 1/3, puis de 3 en 3).

La figure 5 illustre les résultats obtenus (densité optique du signal en fonction de la dilution finale de l'homogénat, à savoir dilution dans l'homogénat
10 négatif x dilution dans le tampon EIA) : la courbe semi-logarithmique présente un aspect sigmoïde, classiquement observé dans tous les dosages de type EIA. De plus, il est à noter une bonne superposition des courbes obtenues à partir des homogénats au 1/10, 1/100 et 1/1 000. Enfin le niveau de sensibilité du test permet de détecter ce cerveau positif dilué au 1/10 000.

15 Dans la figure 6, un autre homogénat au 1/100 a été testé par technique EIA soit après traitement comme décrit ci-dessus, avec une concentration de PK à 400 ng/mg), soit après traitement des homogénats directement par différentes concentrations de PK. Il en ressort que le traitement direct des homogénats par la PK sans purification donne soit des signaux élevés des témoins négatifs pour de faibles
20 concentrations de PK (destruction incomplète de PrPc), soit des signaux faibles pour les vaches positives avec des concentrations élevées de PK. Cet exemple souligne donc le caractère indispensable du traitement des homogénats tel qu'il a été décrit précédemment pour obtenir une détection correcte de la PrPres.

EXEMPLE 8 : Comparaison de différents tampons C.

25 Le protocole de traitement de l'échantillon utilisé est celui de l'exemple 7.

La figure 7 illustre les résultats obtenus.

La guanidine semble apporter un plus, et la combinaison urée-guanidine paraît la plus intéressante (sachant que l'urée est mieux supportée par le test
30 ELISA).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite : elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du

5 cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Procédé de purification de la PrPres à partir d'un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement :

5 (1) l'incubation, pendant 30 secondes à 2 heures, à une température inférieure à 80°C, dudit échantillon biologique avec un tampon A comprenant au moins un agent tensioactif en quantité comprise entre le quart et quatre fois le poids de l'échantillon biologique et éventuellement l'incubation préalable, postérieure ou simultanée avec protéase, pour former une suspension S1 ;

10 (2) l'addition, à ladite suspension S1 obtenue en (1) d'un tampon B en quantité apte à éclaircir ladite suspension par formation d'une microémulsion ou d'une microsuspension, lequel tampon B est constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants, qui ne solubilise pas la PrPres et présente une constante diélectrique comprise entre 10 et 25 ;

(3) la centrifugation de la suspension S2 obtenue à l'étape (2) ; et

15 (4) la solubilisation dudit culot dans un tampon C comprenant au moins un agent tensioactif, tel que défini à l'étape (1), à une concentration comprise entre 0,1 % et 5 %, de préférence comprise entre 0,25 % et 1 %, par rapport au volume de tampon C (p/v) et/ou au moins un agent chaotrope et à une température égale ou supérieure à 80°C.

20 2°) Procédé de purification de la PrPres à partir d'un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement :

25 (1) l'incubation, pendant 30 secondes à 2 heures, à une température inférieure à 80°C, dudit échantillon biologique avec un tampon A comprenant au moins un agent tensioactif en quantité comprise entre le quart et quatre fois le poids de l'échantillon biologique et éventuellement l'incubation préalable, postérieure ou simultanée avec une protéase, pour former une suspension S1 ;

(2) l'addition, à ladite suspension S1 obtenue en (1) d'un tampon B en quantité apte à former une séparation de phase, lequel tampon B est constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants, qui ne solubilise pas la PrPres et présente une
30 constante diélectrique comprise entre 10 et 25 ;

(3) la centrifugation de la suspension obtenue à l'étape (2) :

(4) la récupération du film présent à l'interface :

(5) la resolubilisation dudit film avec un tampon A sans protéase.

(6) la centrifugation de la suspension obtenue à l'étape (5) ; et

5 (7) la solubilisation dudit culot dans un tampon C comprenant au moins un agent tensioactif, tel que défini à l'étape (1), une concentration comprise entre 0,1 % et 5 %, de préférence comprise entre 0.25 % et 1 %, par rapport au volume de tampon C (p/v) et/ou au moins un agent chaotrope et à une température comprise entre la température ambiante et 100°C, de préférence égale ou supérieure à 80°C.

10 3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que lorsque l'échantillon biologique est un tissu ou un organe, ce dernier est, préalablement à l'étape (1), homogénéisé dans un tampon d'homogénéisation, sélectionné dans le groupe constitué par les tampons neutres et les tampons isotoniques.

15 4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la durée d'incubation est de préférence comprise entre 30 secondes à 10 minutes.

5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le tampon A et/ou le tampon C comprend un agent tensioactif sélectionné dans le groupe constitué par :

20 - des tensioactifs anioniques, tels que le SDS (dodécylsulfate de sodium), le sarkosyl (lauroyl-sarcosine), le cholate de sodium, le désoxycholate de sodium, le taurocholate de sodium,

25 - des tensioactifs zwitterioniques, tels que le SB 3-10 (décyl-sulfobétaïne), le SB 3-12 (dodécyl-sulfobétaïne), le SB 3-14, le SB 3-16 (hexadécyl-sulfobétaïne), le CHAPS et le désoxyCHAPS.

- des tensioactifs non-ioniques, tels que le C12E8 (dodécyl-octaéthylène-glycol), le Triton X100, le Triton X114, le Tween 20, le Tween 80, le MEGA 9 (nonanoyl-méthylglucamine), l'octylglucoside, le LDAO (dodécyl-diméthylamine oxyde) ou le NP40 ou

30 - des mélanges de tensioactifs tels qu'un mélange d'un agent tensioactif ionique et d'un agent tensioactif non-ionique, un mélange de deux agents tensio-

actifs ioniques ou un mélange d'un agent tensioactif ionique et d'un agent tensioactif zwitterionique.

6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la température mise en œuvre à l'étape (1) est comprise entre la
5 température ambiante et 50°C, de préférence à 37°C.

7°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'à l'étape (1), la quantité d'agent tensioactif présent dans le tampon A est de préférence comprise entre le quart et une fois et demi le poids de l'échantillon biologique.

10 8°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le tampon B est sélectionné dans le groupe constitué par les alcools en C₃-C₆ et les mélanges d'alcools dont la constante diélectrique théorique moyenne est comprise entre 10 et 25.

15 9°) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les alcools ou mélanges d'alcools suivants sont particulièrement préférés : butanol-1, butanol-2, méthyl-2 propanol-1, isopropanol, isopropanol + pentanol, éthanol + hexanol, butanol + pentanol.

20 10°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la centrifugation de l'étape (3) et de l'étape (5) est de préférence réalisée pendant 2 à 10 minutes à une vitesse inférieure à 20 000 g, de préférence à une vitesse comprise entre 3 500 g et 17 500 g.

25 11°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le tampon C comprend comme agent chaotrope un agent qui est sélectionné dans le groupe constitué par l'urée et la guanidine ou un mélange de ceux-ci.

12°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'étape de solubilisation (étape (4) du procédé selon la revendication 1 ou étape (7) du procédé selon la revendication 2) dans ledit un tampon C comprend le chauffage à une température égale ou supérieure à 80°C, pendant 5 à 10
30 minutes, suivie d'une centrifugation.

13°) Procédé de détection de la PrPres dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

- le traitement dudit échantillon selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

5 - la dilution de l'échantillon obtenu, si nécessaire et
- la détection de la PrPres par toute méthode analytique appropriée.

14°) Kit de traitement d'un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend outre un tampon d'homogénéisation dudit échantillon biologique, des quantités convenables de tampon A, de tampon B et de tampon C, tels que définis aux
10 revendications 1 à 12.

15 15°) Kit de détection de la PrPres, caractérisé en ce qu'il comprend des quantités convenables de tampon d'homogénéisation de l'échantillon biologique dans lequel la PrPres doit être détectée, des quantités convenables de tampon A, de tampon B et de tampon C tels que définis aux revendications 1 à 12, ainsi qu'au moins un anticorps anti-PrPres convenable.

1 / 6

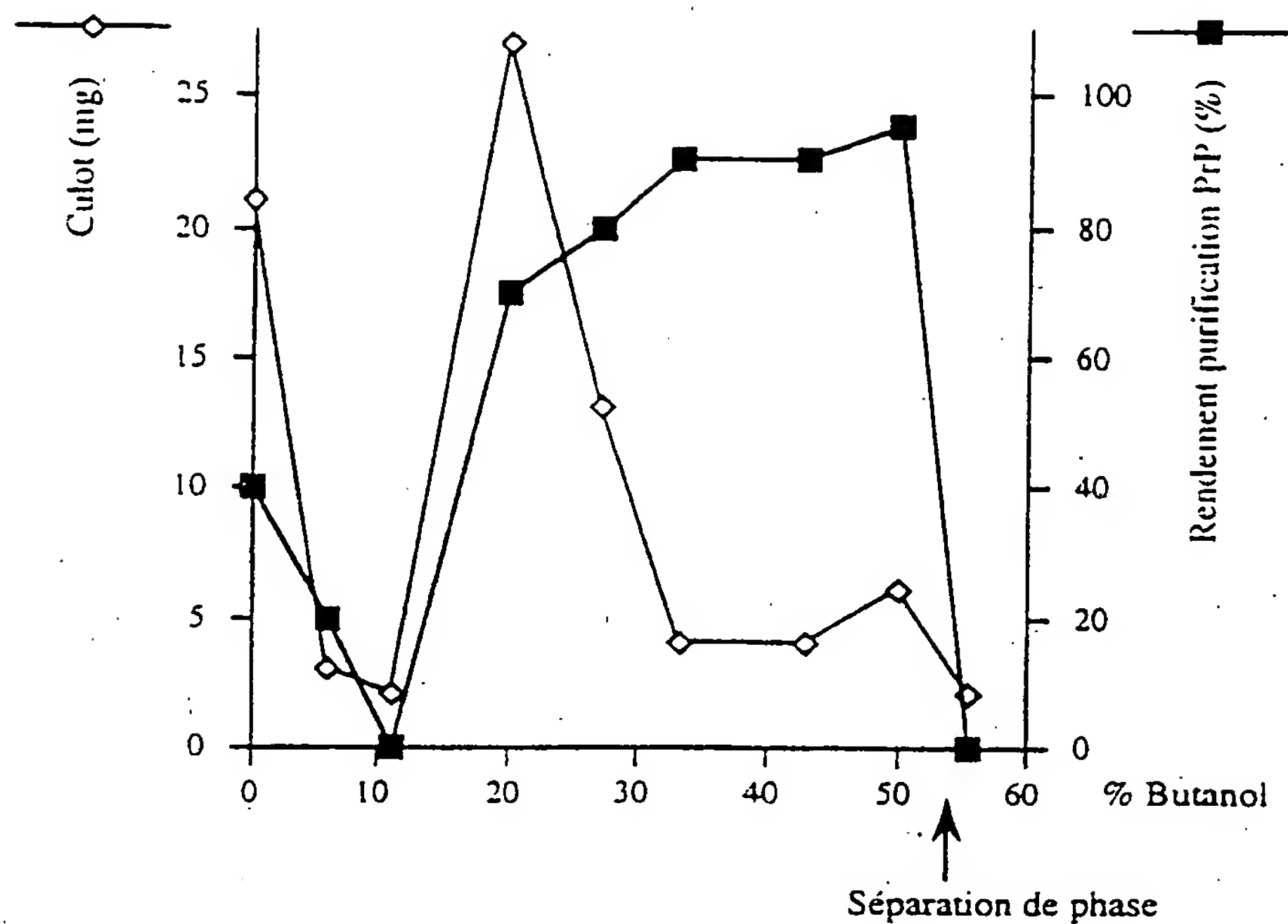


FIGURE 1

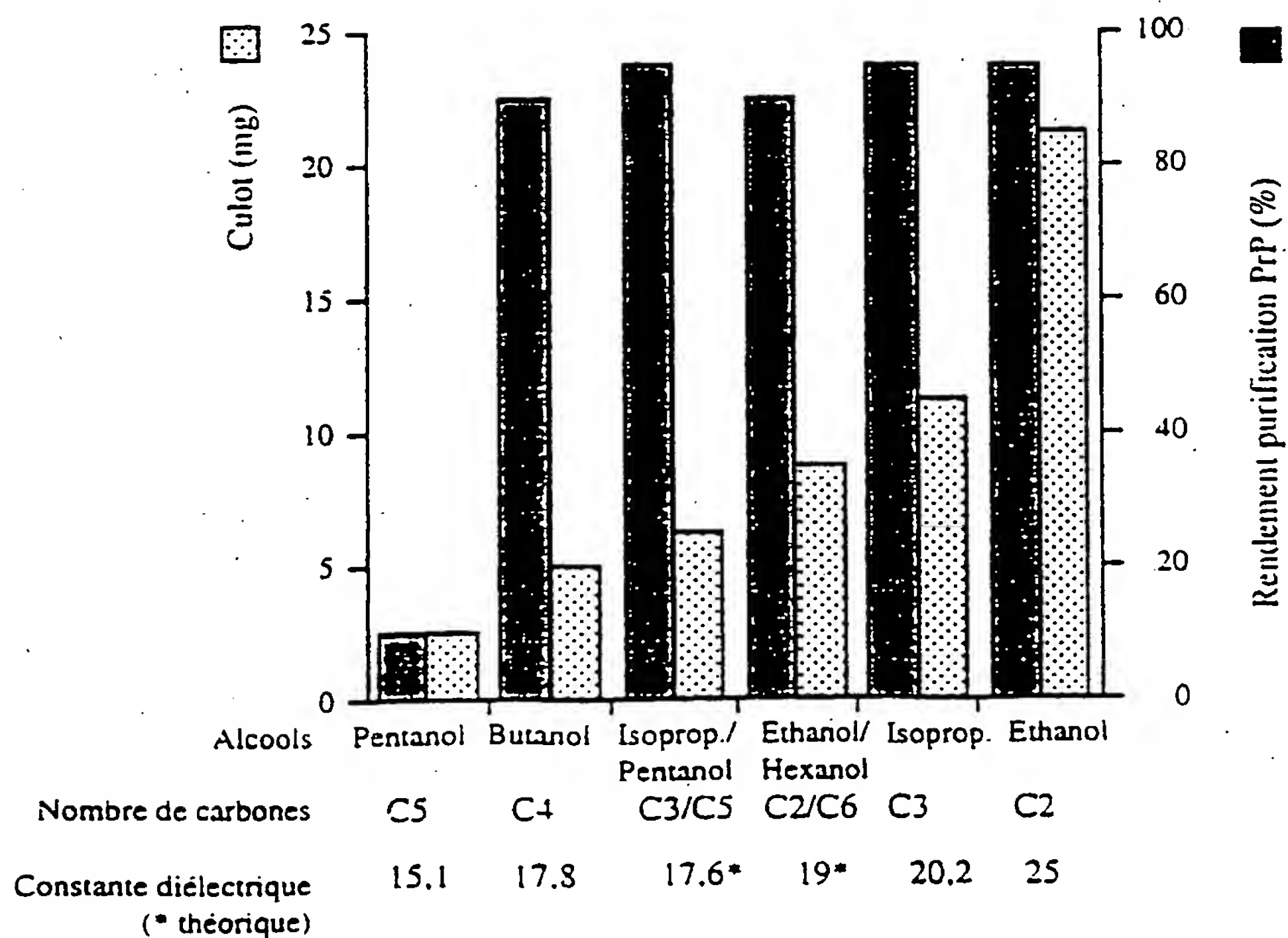


FIGURE 2

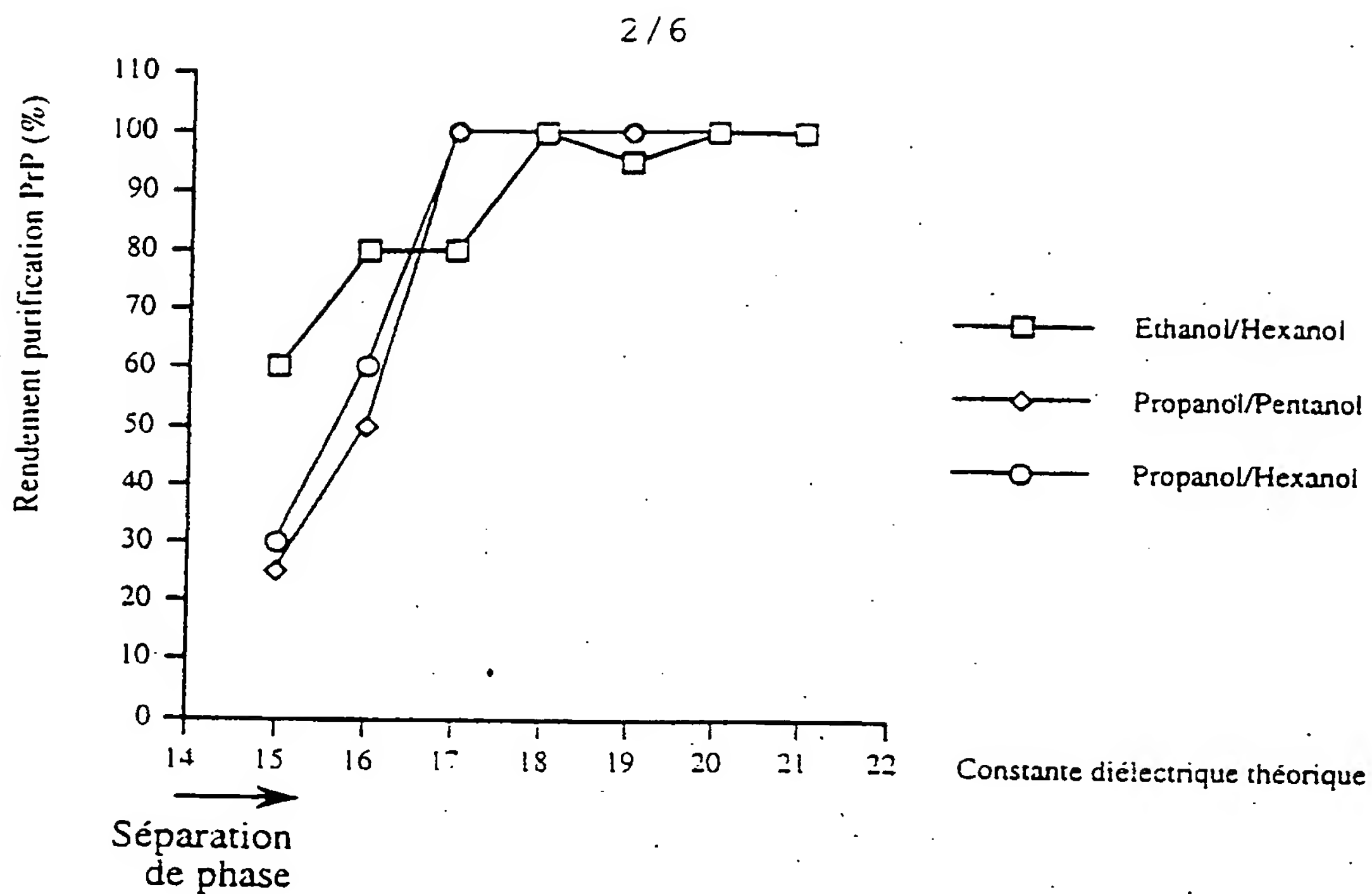


FIGURE 3A

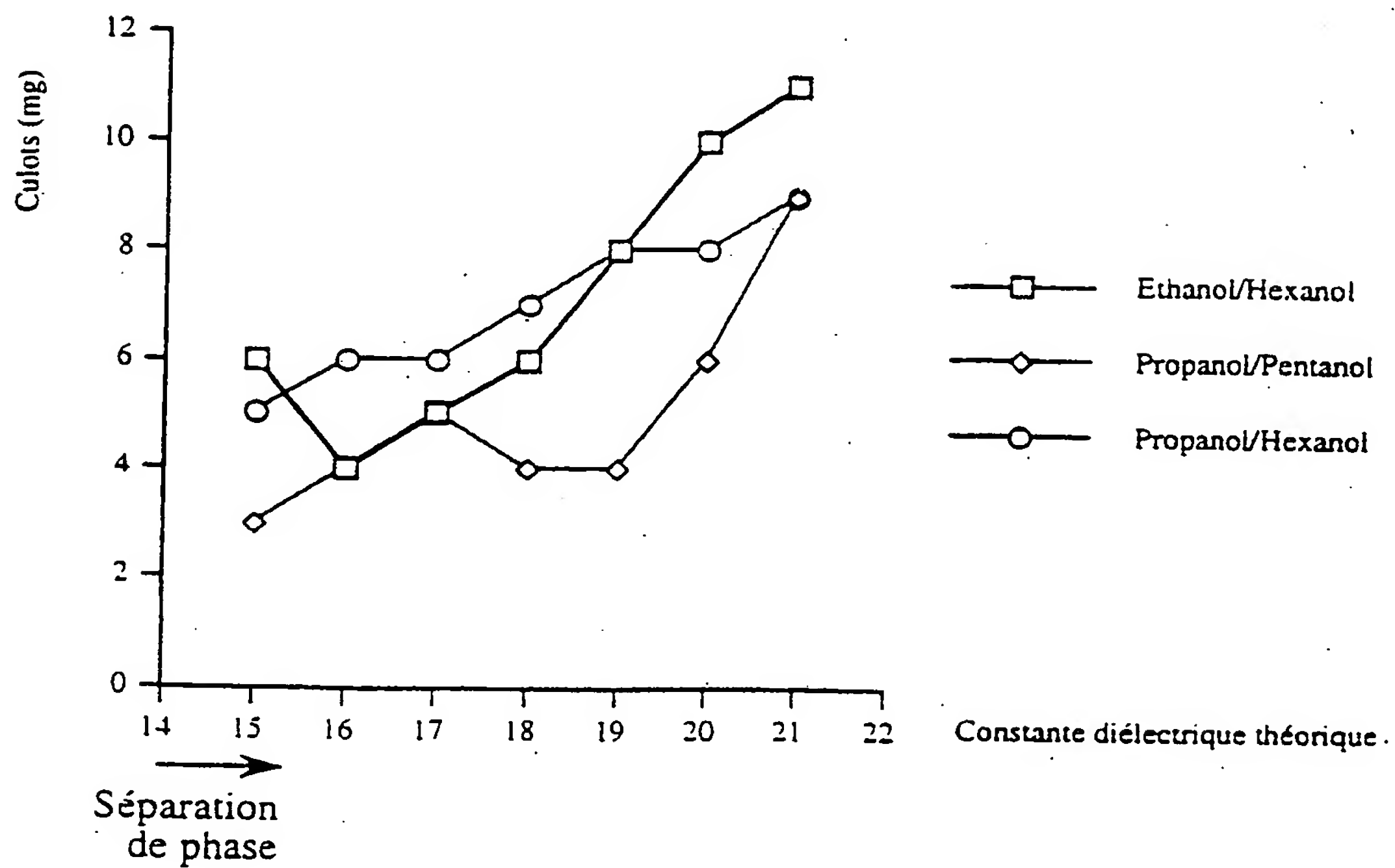


FIGURE 3B

3/6

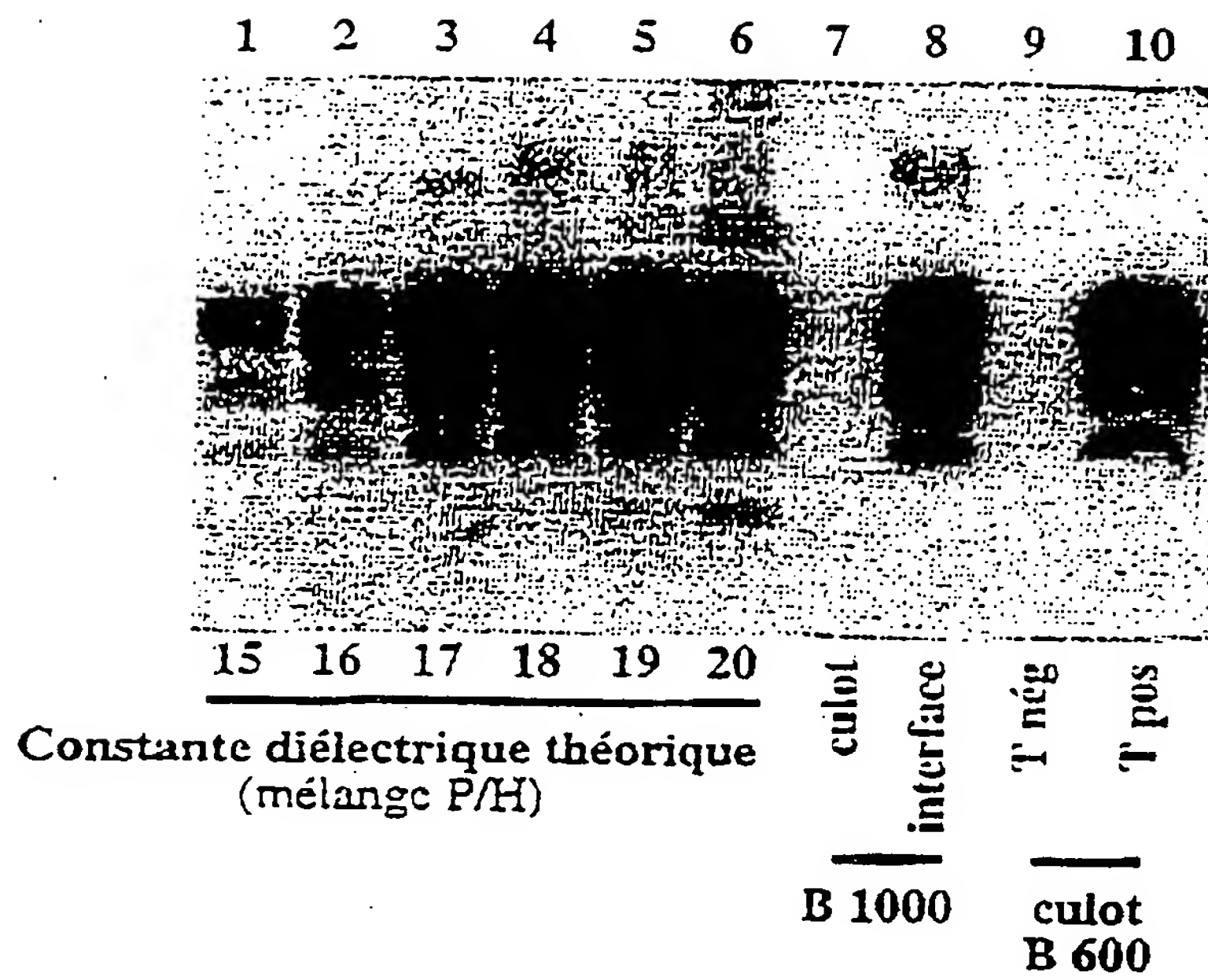
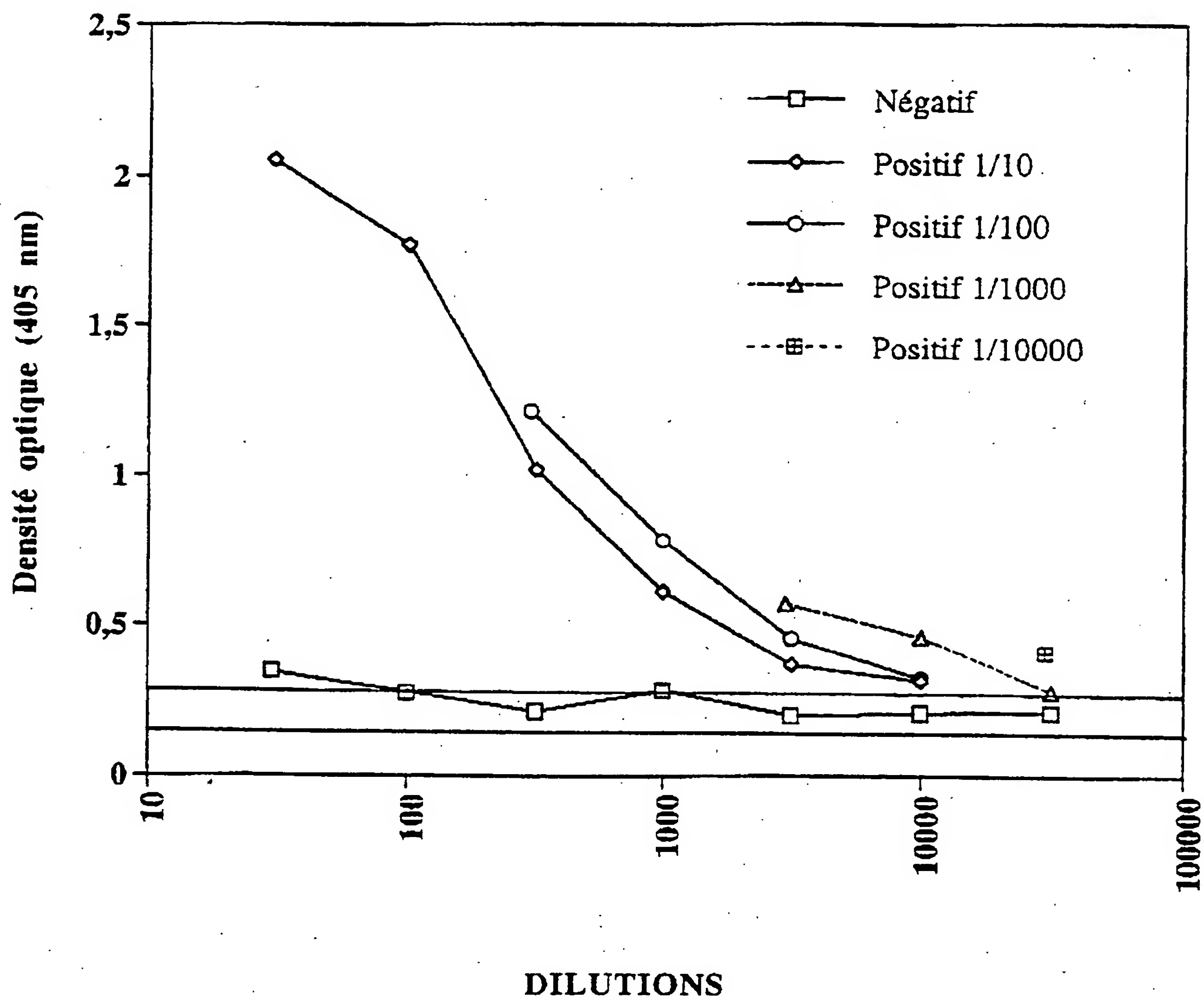


Figure 4

4 / 6

FIGURE 5

5/6

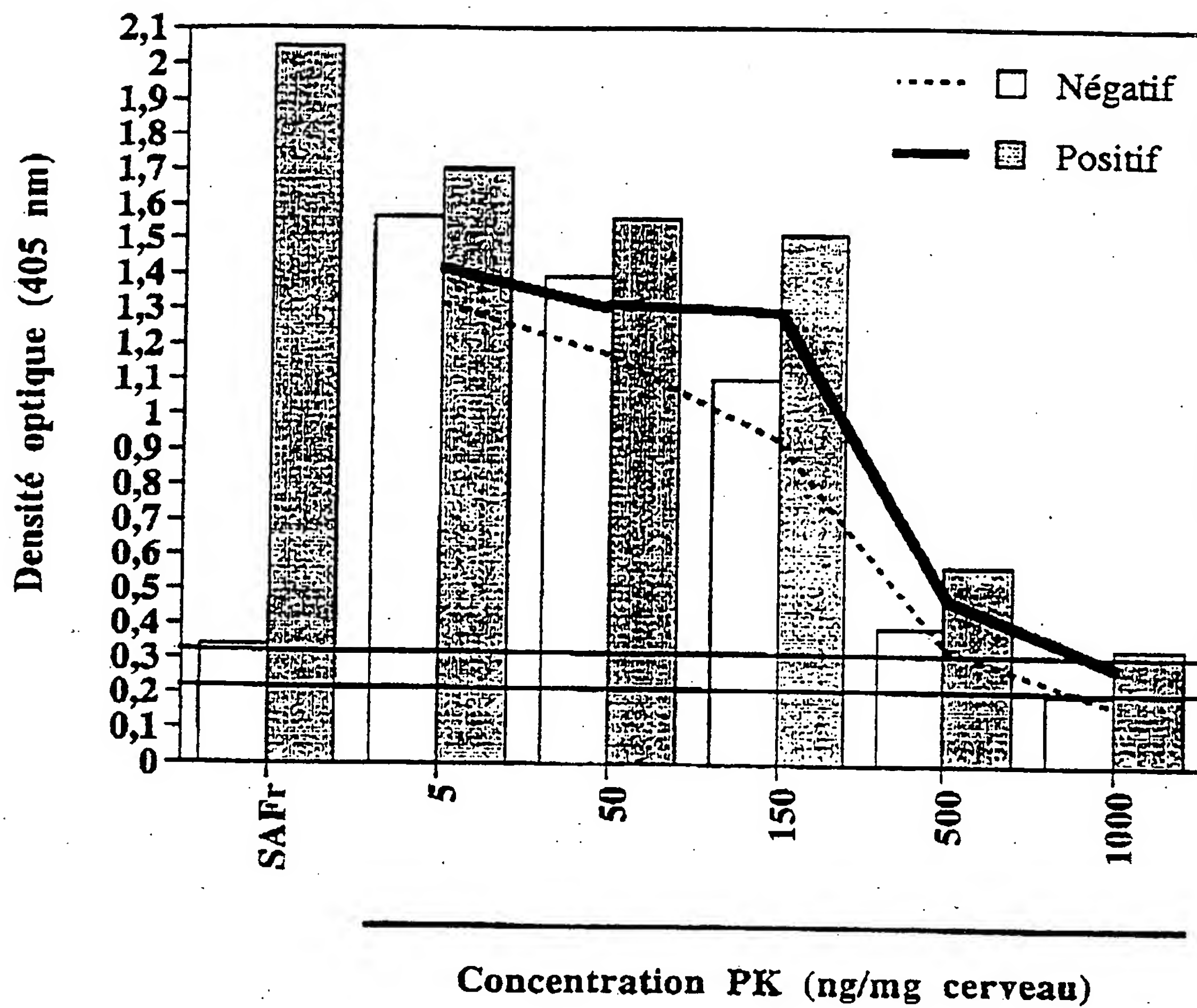


FIGURE 6

Comparaison de différents tampons C :
Homogénats positif au 1/100 ou négatif
Résultats pour des échantillons dilués au 1/3 dans le tampon EIA.

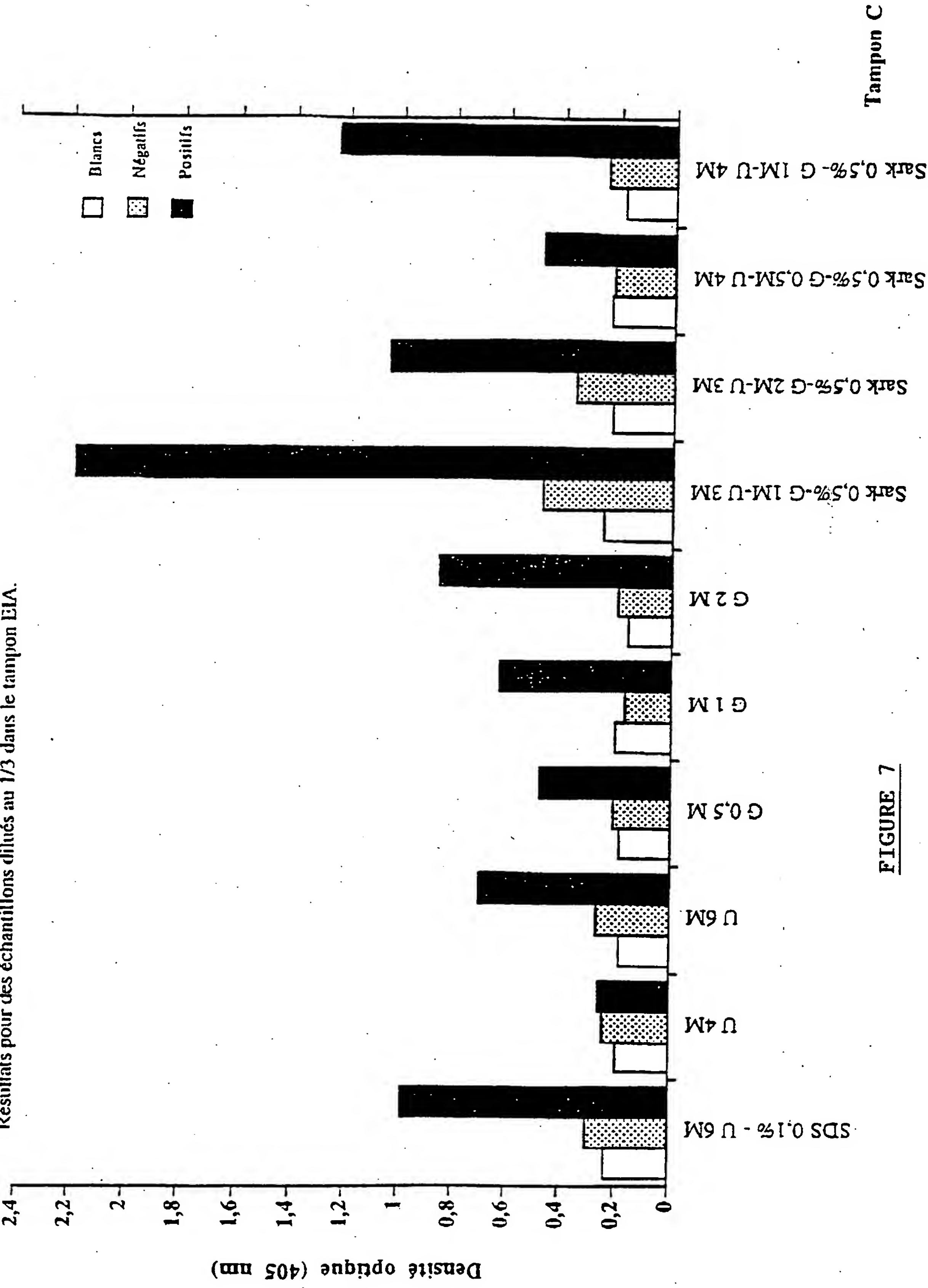


FIGURE 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/FR 99/00338

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/47 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
----------	--	-----------------------

A	<p>S LEHMANN & D A HARRIS: "Two mutant prions expressed in cultured cells acquire biochemical properties reminiscent of the scrapie isoform."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA.,</p> <p>vol. 93, May 1996, pages 5610-5614,</p> <p>XP002084017</p> <p>WASHINGTON US</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-14
---	---	------

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 June 1999

Date of mailing of the international search report

09/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/FR 99/00338

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>S G CHEN ET AL.: "Allelic origin of the abnormal prion protein isoform in familial prion disease"</p> <p>NATURE MEDICINE.,</p> <p>vol. 3, no. 9, September 1996, pages 1009-1015, XP002084018</p> <p>CO US</p> <p>see page 1014</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-14
A	<p>File Medline, abstract no. 92046319, 1992 XP002084019</p> <p>& B CAUGHEY ET AL.: "N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease (s): implications regarding the conversion of PrP to the protease-resistant state"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY.,</p> <p>vol. 65, no. 12, December 1991, pages 6597-6603,</p> <p>see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-14
A	<p>File Medline, abstract 91140725, 1991 XP002084020</p> <p>& M P MC KINLEY ET AL.: "Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY,</p> <p>vol. 65, no. 3, March 1991, pages 1340-1351,</p> <p>see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-14
T	<p>WO 98 30909 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 16 July 1998</p> <p>see page 7 - page 8</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00338

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9830909 A	16-07-1998	FR 2758337 A	17-07-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No
PCT/FR-99/00338

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C07K14/47 G01N33/68		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C07K G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	S LEHMANN & D A HARRIS: "Two mutant prions expressed in cultured cells acquire biochemical properties reminiscent of the scrapie isoform." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 93, mai 1996, pages 5610-5614, XP002084017 WASHINGTON US voir le document en entier --- -/--	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
Categories spéciales de documents cités:		
<p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 1 juin 1999		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 09/06/1999
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Masturzo, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No

PCT/FR 99/00338

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités. avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>S G CHEN ET AL.: "Allelic origin of the abnormal prion protein isoform in familial prion disease" NATURE MEDICINE., vol. 3, no. 9, septembre 1996, pages 1009-1015, XP002084018 CO US voir page 1014</p> <p>---</p>	1-14
A	<p>File Medline, abstract no. 92046319, 1992 XP002084019 & B CAUGHEY ET AL.: "N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease (s): implications regarding the conversion of PrP to the protease-resistant state" JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 65, no. 12, décembre 1991, pages 6597-6603, voir abrégé</p> <p>---</p>	1-14
A	<p>File Medline, abstract 91140725, 1991 XP002084020 & M P MC KINLEY ET AL.: "Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 65, no. 3, mars 1991, pages 1340-1351, voir abrégé</p> <p>---</p>	1-14
T	<p>WO 98 30909 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 16 juillet 1998 voir page 7 - page 8</p> <p>-----</p>	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De de Internationale No

PCT/FR 99/00338

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9830909 A	16-07-1998	FR 2758337 A	17-07-1998